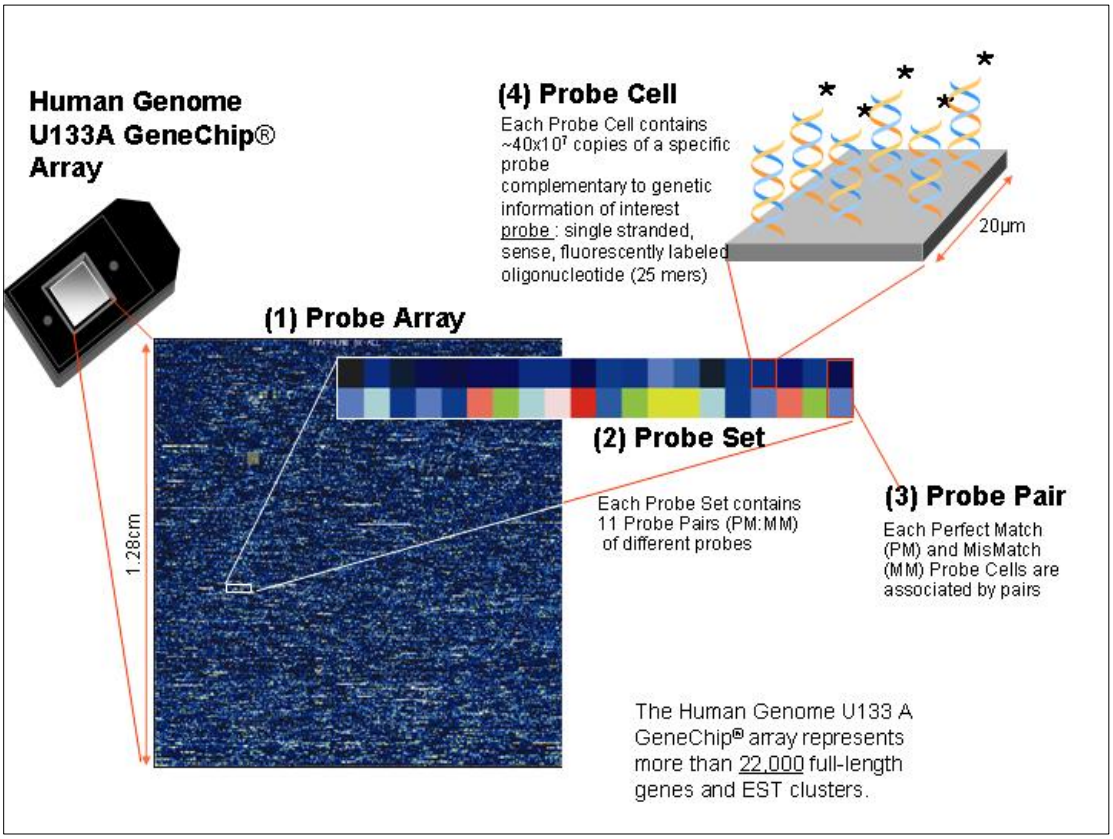
UNIDAD DE GENÓMICA
CABIMER

Guía de usuario de Microarray Affymetrix

La tecnología de Microarrays, basada en la complementariedad de bases de los ácidos nucleicos, puesta a punto por Affymetrix permite el análisis funcional del genoma. Dicha plataforma está permanentemente actualizada, es de alta reproducibilidad y exactitud, motivos por los cuales es una de las más utilizadas en el mundo. Esto permite una comparación directa de datos con los de otros laboratorios, y se encuentra en sincronía con las necesidades de nuestra comunidad científica.

Los Microarrays de Affymetrix se obtienen mediante la síntesis de oligonucleótidos de 25-mer utilizando la técnica de fotolitografía sobre una superficie de cuarzo.



Representación esquemática del sistema de análisis de expresión 3´ GeneChip® de Affymetrix. Imagen tomada de http://www.weizmann.ac.il/home/ligivol/research_interests.html.

Las muestras de RNA se marcan con biotina y cada muestra se hibrida en un array independiente.

Para su procesamiento se utiliza la Estación Fluídica 450 de Affymetrix.

La Unidad dispone del Scanner modelo "3000 7G" para la captura de la imagen, que tras la hibridación se lleva a cabo.

Posteriormente se analizan de forma rutinaria los GeneChips® escogidos según el objetivo del experimento.

Los GeneChips® específicos para cada genoma y tipo de análisis están disponibles en la *web* de Affymetrix (http://www.affymetrix.com/products/arrays/index.affx). Según el objetivo del estudio, destacan:

- "***3´ Expression Arrays***", 11 sondas/gen que hibridan con la región 3´ del transcrito. Para el análisis convencional de patrones de expresión basado en secuencias predichas y bien anotadas de mensajeros.

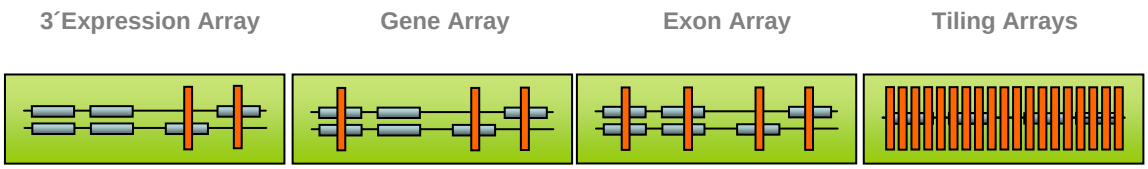
- "***Gene Array***", 26 sondas/gen diseñadas a lo largo del gen completo. Para estudios de expresión diferencial más completos (consideran también transcritos sin extremos PolyA), más concretos (sólo genes bien anotados) y más económicos que los "3´ Expression Arrays".

- "***Exon Array***", 4 sondas/exón y 40 sondas/gen (10 exones). Para estudios de niveles de expresión génica y a nivel de exones.

- "***miRNA Array***", miRNA de mas de 70 organismos distintos (principalmente humanos, rata, ratón y primates) y snoRNA y scaRNA de humanos.

- "***Tiling Arrays***" (**Whole-Genome Array**) que cubren todo el genoma y pueden ser empleados para estudios de Mapeo transcripcional completo y de Interacciones proteína/DNA a nivel genómico (ChIP-on-Chip).

  En el caso de ratón existen arrays específicos para ChIP-on-Chip de regiones promotoras, "***Promoter Arrays***" (1 sólo array para todo el genoma).
  Para humanos también existen "***Promoter Arrays***" y arrays basados en el proyecto ENCODE, "***ENCODE Arrays***", que sirven para cualquier aplicación.



➢ Recomendaciones para el Diseño del experimento

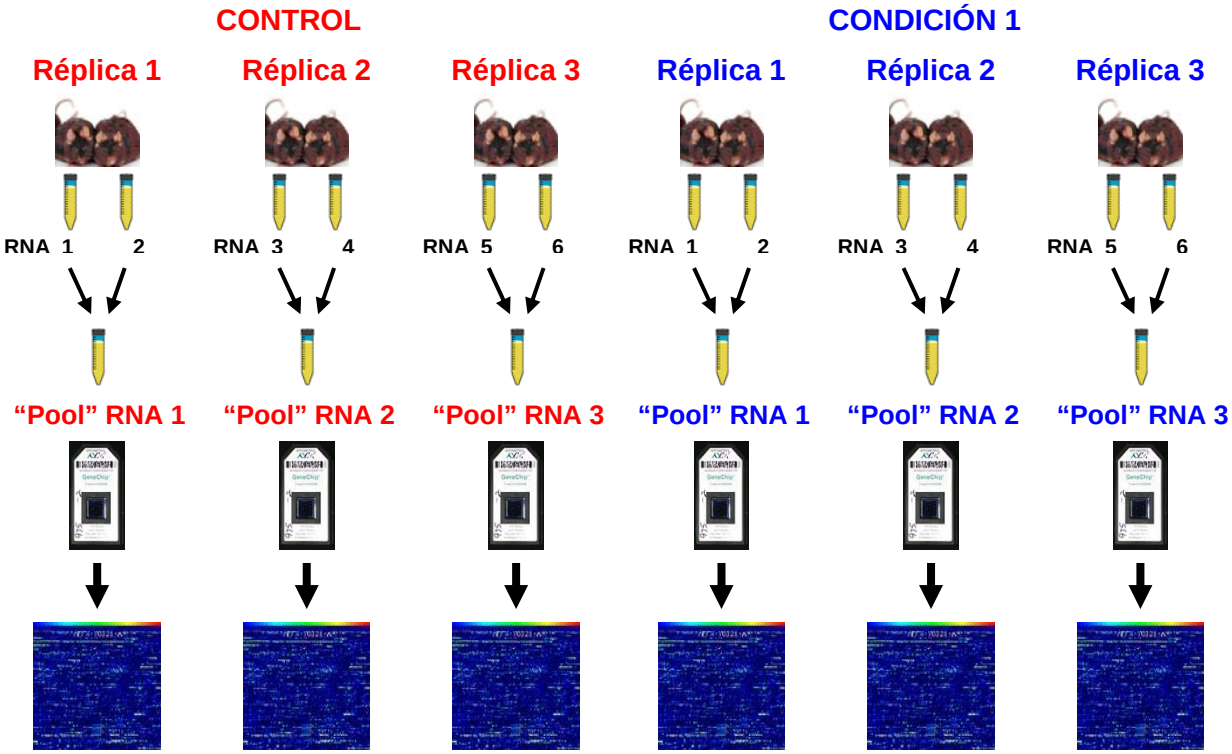
Antes de utilizar el Servicio de Genómica hay algunos requisitos importantes de los que depende la obtención de resultados fiables y reproducibles, dado la gran inversión de tiempo y dinero en estos experimentos:

a. Cuál es el **objetivo** de dicho experimento, es decir, qué respuestas son las que buscamos.

b. Establecer los **controles** más apropiados para las muestras a estudiar.

c. Definir **nº de réplicas** por cada condición experimental para promediar los resultados y que éstos sean estadísticamente significativos. Como mínimo son necesarias 3.

d. En el caso de estudios de expresión, para disminuir la variabilidad de cada individuo es recomendable hacer mezclas ("pooles") de las muestras.



RECOMENDACIONES DISEÑO EXPERIMENTAL.
1 Hibridación = 1 Réplica de 1 Condición Experimental
- Mínimo 3 Réplicas c/ Condición Experimental

➢ Requisitos de las muestras

1. Análisis de perfiles de expresión génica

Tanto para los "3´ Expression Arrays", como para los "Exon Arrays", "Gene Arrays" y "miRNA Arrays".

a. **Aislamiento del RNA**: Es imprescindible que el usuario obtenga un de un RNA de alta calidad y pureza. El método que da mejores resultados es la extracción con TRIzol (Invitrogen cat: 15596-026) según recomienda Affymetrix, con una purificación adicional por columnas RNeasy de QIAGEN (Qiagen RNeasy, cat: 74104). La purificación por Kits de extracción de RNA de Qiagen son igualmente recomendables, fiables y productivas.

b. **RNA resuspendido en Agua libre de RNAsas.** La cantidad dependerá del protocolo de marcaje, usándose uno u otro según la disponibilidad de material de partida para las muestras que vayan a ser marcadas y del tipo de array que se vaya a hibridar:

3´ Expression Array

- No menos de **250 ng RNA total**, dilución mínima de 40 ng/µl.

Gene Array

- No menos de **500 ng RNA total**, dilución mínima de 100 ng/µl.

Exon Array

- No menos de **500 ng RNA total**, dilución mínima de 100 ng/µl.

miRNA Array

- No menos de **5 ug RNA total**, dilución mínima de 200 ng/µl.

No existe ningún inconveniente en mandar más cantidad de RNA o más concentrada. Si la cantidad de muestra que se puede obtener es problemática o hay cualquier duda sobre ella o la concentración de la misma, ponerse en contacto con la Unidad.

c. Al menos **3 réplicas** por condición experimental.

d. Todas las muestras deberán estar correctamente identificadas (mínimo de 3 caracteres) y acorde a la **Hoja de solicitud** debidamente cumplimentada que debe acompañar a las muestras. PDF

El análisis de Calidad de las muestras está incluido en el servicio. Al llegar las muestras a la Unidad se procederá a la cuantificación de éstas así como a la determinación de su integridad por medio del Bioanalyzer 2100. Las que no pasen un mínimo de calidad exigida se le comunicará al usuario junto con una explicación y recomendaciones para la obtención de muestras adecuadas.

2. Análisis de regulación y genomas completos

Para ello, los distintos tipos de Microarrays disponibles hasta el momento son los de "Promoter Arrays", "ENCODE Arrays" o los de "Tiling Arrays". Según la aplicación los requisitos son los siguientes:

Mapeo Transcripcional

a. **Cantidad de RNA:** RNA total aislado mediante columnas RNeasy de QIAGEN (Qiagen RNeasy, cat: 74104). No menos de 6ug de RNA total para muestras de ratón y humanos (concentración mínima de 0,24 µg/µl); y 7ug de RNA total para muestras de levaduras (S.cerevisiae, S.pombe), Drosohila, C. elegans y A.thaliana con una concentración mínima de 1ug/uL.

b. Muestras resuspendidas en **Agua libre de RNAsas/DNAsas.**

c. Al menos **3 réplicas** por condición experimental.

e. Todas las muestras deberán estar correctamente identificadas (mínimo de 3 caracteres) y acorde a la **Hoja de solicitud** debidamente cumplimentada que debe acompañar a las muestras. PDF

ChIP-on-Chip

a. **Cantidad de DNA inmunoprecipitado.** Entre 5-50 ng según el estudio, con un enriquecimiento de entre 5 y 8 veces.

b. Muestras resuspendidas en **Agua libre de RNAsas/DNAsas.**

c. Recomendable **2 ó 3 réplicas** por condición experimental.

d. Todas las muestras (en tubos eppendorf de 1.5mL) deberán estar correctamente identificadas (mínimo de 3 caracteres) y acorde a la **Hoja de solicitud** debidamente cumplimentada que debe acompañar a las muestras. PDF

Para cualquier duda puede ponerse en contacto con el Servicio de Genómica a través de las siguientes direcciones de correo electrónico, Eloisa Andujar, Mónica Pérez, Andrés Aguilera o en el teléfono 954 467 828.

- **Envío de muestras**

Las muestras de RNA/DNA, una vez purificadas y en las concentraciones indicadas en los apartados anteriores se enviarán congeladas en nieve carbónica **en tubos Eppendorf® de 1,5 mL** en **Agua libre de RNAsas** , junto con una copia original impresa del **Formulario de Solicitud** cumplimentado correctamente. PDF

Si por algún motivo ajeno a la Unidad, una vez realizada la solicitud, el usuario cancelara la misma, el material fungible correspondiente le será facturado.

La dirección a la cual pueden ser remitidas es:

Unidad de Genómica
Centro Andaluz de Biología Molecular y
Medicina Regenerativa (Cabimer)
Avda. Américo Vespucio s/n
Parque Tecnológico Cartuja´93
41.092 SEVILLA

Horario de recepción de muestras: 9:00 h a 17:00 h.

El envío de las muestras debe ser comunicado previamente por teléfono (954-467828) o por e-mail (eloisa.andujar@cabimer.es/monica.perez@cabimer.es).

Por su parte, la Unidad de Genómica comunicará vía e-mail la recepción de las mismas así como cualquier problema que pueda surgir tras los controles de calidad realizados sobre éstas.

- **Entrega de los Resultados**

Una vez terminado el experimento y obtenidos los datos de su análisis (*.CEL), los resultados se le enviarán al usuario vía e-mail junto con un informe final.

En el caso de **Estudios de expresión** se les enviará los ficheros *.CEL y *.CHP que contienen toda la información de cada microarray y un documento Excel en el que se incluyen los datos brutos y normalizados por estadístico, así como análisis comparativo apropiado. Este documento Excel incluye varias Hojas que contienen concretamente la siguiente información:

a. La primera hoja contiene los datos normalizados por RMA (Robust Microarray Average), que sólo da valores numéricos en log2, pero que permite la comparación directa entre el valor de expresión de un gen en un experimento, con el de otro experimento (ya sea réplica u otra condición experimental distinta). También se muestra en esta hoja el símbolo del gen correspondiente, así como la descripción. Estos valores corresponden a las intensidades relativas de las hibridaciones de las moléculas de RNA/DNA con cada sonda representada en el array (Unidades de Fluorescencia).

b. En las demás Hojas (según comparaciones), vuelven a estar los datos normalizados de cada réplica, se mostrarán una serie de parámetros y algoritmos que corresponden al **Análisis Estadístico** realizado por LIMMA (Linear Models for Microarray Analysis) entre los que se incluyen: Nivel de cambio de expresión, Grado de confianza, etc…. Esto permitirá al usuario establecer cortes significativos para poder seleccionar grupos de genes diferencialmente expresados.

Esta información se ofrece en un **plazo máximo de 15 días** desde el comienzo del análisis.

- **Tarifas**

Consultar con la Unidad.

- **Información de interés**

Affymetrix
http://www.affymetrix.com

3´ Expression Array
GeneChip® Human Genome U133 Arrays
http://www.affymetrix.com/products_services/arrays/specific/hgu133plus.affx#1_2

Exon Array
GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array
http://www.affymetrix.com/products_services/arrays/specific/exon.affx#1_2

Gene Array
GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array
http://www.affymetrix.com/products_services/arrays/specific/hugene_1_0_st.affx#1_4

Tiling Array (Chip on Chip)
GeneChip® Human Tiling 2.0R Array Set (14 arrays)
http://www.affymetrix.com/products_services/arrays/specific/human_tiling_2.affx#1_2

Tiling Array (Transcript Mapping)
GeneChip® Human Tiling 1.0R Array Set (7 arrays)
http://www.affymetrix.com/products_services/arrays/specific/human_tiling.affx

miRNA
http://www.affymetrix.com/products_services/arrays/specific/mi_rna.affx#1_2